

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/FR04/002848

International filing date: 05 November 2004 (05.11.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: FR
Number: 0313056
Filing date: 06 November 2003 (06.11.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 11 March 2005 (11.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



01 FEV. 2005

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 17 NOV. 2004

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr





26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*03

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE page 1/2

BR1

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W / 210502

Réservé à l'INPI

REMISE DES PIÈCES

DATE **6 NOV 2003**LIEU **69 INPI LYON**N° D'ENREGISTREMENT **0313056**

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE

- 6 NOV. 2003

PAR L'INPI

Vos références pour ce dossier
(facultatif) **240975 D21726 FT**

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

Cabinet REGIMBEAU
129, rue Servient
69326 LYON CEDEX 03
FRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie

☐ N° attribué par l'INPI à la télécopie

2 NATURE DE LA DEMANDE

Cochez l'une des 4 cases suivantes

Demande de brevet

☒

Demande de certificat d'utilité

☐

Demande divisionnaire

☐*Demande de brevet initiale*

N°

Date

ou demande de certificat d'utilité initiale

N°

Date

Transformation d'une demande de

brevet européen *Demande de brevet initiale*

N°

Date

3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

Souches de microorganismes optimisées pour des voies de biosynthèses consommatrices de NADPH

4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ

OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE

LA DATE DE DÉPÔT D'UNE

DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

☐ S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»

5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)

☒ Personne morale☐ Personne physiqueNom
ou dénomination sociale

METABOLIC EXPLORER

Prénoms

Forme juridique

N° SIREN

Code APE-NAF

423703107

Domicile

Rue

BIOPOLE CLERMONT-LIMAGNE

63360 SAINT BEAUZIRE FRANCE

ou
siège

Code postal et ville

Pays

FRANCE

Française

Nationalité

N° de téléphone (facultatif)

N° de télécopie (facultatif)

Adresse électronique (facultatif)

☐ S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»Remplir impérativement la 2^{ème} page

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE
page 2/2

BR2



Réservé à l'INPI

REMISE DES PIÈCES

DATE

6 NOV 2003

LIEU

69 INPI LYON

N° D'ENREGISTREMENT

0313056

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DB 540 W / 210502

6 MANDATAIRE (*s'il y a lieu*)

Nom

240975 FT

Prénom

Cabinet ou Société

Cabinet REGIMBEAU

N° de pouvoir permanent et/ou
de lien contractuel

Adresse

Rue

129, rue Servient

Code postal et ville

69326 LYON CEDEX 03

Pays

N° de téléphone (*facultatif*)

04 26 84 34 40

N° de télécopie (*facultatif*)

04 26 84 34 49

Adresse électronique (*facultatif*)

lyon@regimbeau.fr

7 INVENTEUR (S)

Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques

Les demandeurs et les inventeurs
sont les mêmes personnes

☐ Oui

☒ Non : **Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)**

8 RAPPORT DE RECHERCHE

Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)

Établissement immédiat
ou établissement différé

☒

☐

Paiement échelonné de la redevance
(*en deux versements*)

Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt

☐ Oui

☐ Non

**9 RÉDUCTION DU TAUX
DES REDEVANCES**

Uniquement pour les personnes physiques

☐ Requête pour la première fois pour cette invention (*joindre un avis de non-imposition*)

☐ Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (*joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence*): AG

**10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES
ET/OU D'ACIDES AMINÉS**

☐ Cochez la case si la description contient une liste de séquences

Le support électronique de données est joint

☐

La déclaration de conformité de la liste de
séquences sur support papier avec le
support électronique de données est jointe

☐

Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite»,
indiquez le nombre de pages jointes

**11 SIGNATURE DU DEMANDEUR
OU DU MANDATAIRE**
(Nom et qualité du signataire)

Franck Telozy
CPI - 99-1173

Mely

VISA DE LA PRÉFECTURE
OU DE L'INPI

INPI

La présente invention concerne des souches de microorganismes optimisées pour la production par biotransformation de molécules ayant des voies de biosynthèse consommatrices de NADPH. Les souches selon l'invention sont utilisables dans des procédés de biotransformation consommatrices de NADPH. Les souches définies selon
5 l'invention peuvent être procaryotiques ou eucaryotiques. Dans un mode de réalisation préféré, ladite souche procaryotique est une souche d'*E. coli*. Dans un autre mode de réalisation, ladite souche eucaryotique est une souche de *Saccharomyces*, en particulier *S. cerevisiae*.

La présente invention concerne également un procédé de préparation de
10 molécules par biotransformation comprenant la culture dans un milieu approprié d'une souche optimisée selon l'invention, ladite souche optimisée comprenant également les éléments génétiques nécessaires à la préparation de ladite molécule.

Les procédés de biotransformation ont été développés pour permettre la production de molécules en grande quantité à des coûts faibles, tout en permettant
15 également la valorisation de différents sous-produits industriels ou de l'agriculture.

Pour produire des molécules d'intérêt par biotransformation *in vivo* on distinguera deux grandes approches :

- d'une part la fermentation qui permet la production de molécules par un microorganisme à partir d'une source de carbone simple (e.g. WO0102547 qui décrit
20 la production de lysine par fermentation de *C. glutamicum* en présence de glucose),
- d'autre part la bioconversion par un microorganisme d'un co-substrat donné en une molécule d'intérêt (e.g. WO0012745 qui décrit la production de dérivés R-pipéridine, WO0068397 qui décrit la production de tagatose) Le co-substrat est non assimilable ; il est différent de la source de carbone qui est utilisé seulement pour
25 produire la biomasse et le NADPH nécessaire à la bioconversion.

L'amélioration d'un procédé de biotransformation peut porter sur différents facteurs comme la température, l'oxygénation, la composition du milieu, le procédé de récupération, etc. On peut aussi envisager de modifier le microorganisme de telle sorte que la production de la molécule d'intérêt et/ou son excrétion soit augmentée.

Dans le cadre d'une fermentation on s'attachera par exemple à optimiser la voie de biosynthèse, par exemple en modifiant la régulation des gènes ou en modifiant le gène afin de modifier les caractéristiques enzymatiques ou encore en optimisant la régénération des cofacteurs.

5 Dans le cadre de la bioconversion on s'attachera davantage à réduire la formation de co-produits et à optimiser la régénération de cofacteurs impliqués dans la ou les étapes de bioconversion.

Parmi les cofacteurs impliqués dans les biotransformations, le NADPH prend une part importante notamment pour la production des acides aminés (*e.g.* arginine, proline, isoleucine, méthionine, lysine), de vitamine (*e.g.* panthotenate, phylloquinone, 10 tocopherol), de molécules aromatiques (*e.g.* WO9401564), de polyols (*e.g.* xylitol), de polyamine (*e.g.* spermidine) ou d'autres molécules à haute valeur ajoutée.

La présente invention concerne donc une souche de microorganismes optimisée pour la production de molécules ayant des voies de biosynthèse consommatrices de 15 NADPH.

Au lieu d'essayer d'optimiser pour chaque biotransformation le ratio NADPH/NADP dans le microorganisme, les inventeurs ont opté pour la production de microorganismes modifiés afin d'obtenir différents ratios NADPH/NADP, lesdits microorganismes modifiés étant ensuite employés pour réaliser les biotransformations 20 consommatrices de NADPH.

Le principe de l'optimisation du ratio NADPH/NADP consiste à limiter les activités enzymatiques impliquées dans l'oxydation du NADPH notamment au profit de la réduction du NAD ainsi qu'à favoriser les activités enzymatiques permettant la réduction du NADP en NADPH. On limite les activités impliquées dans l'oxydation du 25 NADPH au profit de la réduction du NAD en diminuant, plus particulièrement en inactivant, les activités transhydrogénase (UdhA, Qor). On favorise les activités enzymatiques permettant la réduction du NADP en imposant le flux de carbone via le cycle des pentoses phosphate et/ou en modifiant la spécificité de co-facteur d'une enzyme de telle sorte qu'elle utilise le NADP préférentiellement au NAD, son cofacteur 30 habituel.

Par souche de microorganismes, on entend selon l'invention un ensemble de microorganismes d'une même espèce comprenant au moins un microorganisme de ladite espèce. Ainsi, les caractéristiques décrites pour la souche s'appliquent à chacun des microorganismes de ladite souche. De même, les caractéristiques décrites pour l'un des
5 microorganismes de la souche s'appliqueront à l'ensemble desdits microorganismes la composant.

Parmi les microorganismes optimisés selon l'invention, on citera les bactéries et les levures, les champignons filamenteux et notamment les bactéries et les levures des espèces suivantes : *Aspergillus sp.*, *Bacillus sp.*, *Brevibacterium sp.*, *Clostridium sp.*,
10 *Corynebacterium sp.*, *Escherichia sp.*, *Gluconobacter sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Rhodococcus sp.*, *Saccharomyces sp.*, *Streptomyces sp.*, *Xanthomonas sp.*, *Candida sp.*

L'optimisation du NADPH est décrite ci-après pour *E. coli* et *S. cerevisiae*. Le même principe peut être appliqué de manière similaire à tous les microorganismes cultivés en conditions aérobies.

15 Les souches optimisées pour la production de NADPH (*i.e.* capacité accrue de réduction du NADP+) selon l'invention comprennent une délétion du gène *udhA* et/ou du gène *gor*. Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, les gènes *udhA* et *gor* sont tous deux délétés.

Par « délétion », on entend selon l'invention une suppression de l'activité du
20 gène « délété ». Cette suppression peut être une inactivation du produit d'expression du gène concerné par un moyen approprié, ou bien l'inhibition de l'expression du gène concerné, ou encore la délétion d'au moins une partie du gène concerné de manière soit que son expression n'ait pas lieu (par exemple délétion d'une partie ou de l'ensemble de la région promotrice nécessaire à son expression) soit que le produit d'expression ait
25 perdu sa fonction (par exemple délétion dans la partie codante du gène concerné).

De manière préférentielle, la délétion d'un gène comprend la suppression de l'essentiel dudit gène, et le cas échéant son remplacement par un gène marqueur de sélection permettant de faciliter l'identification, l'isolement et la purification des souches optimisées selon l'invention.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, la souche optimisée selon l'invention comprend également une délétion d'un gène pris parmi *pgi* ou *pfkA* et/ou *pfkB* et/ou une modification d'au moins un gène pris parmi *lpd*, *gapA* ; la modification consistant à modifier la préférence de l'enzyme au profit du NADP au lieu du NAD, son
5 cofacteur habituel.

Les souches selon l'invention ayant la délétion du gène *pfkA* sont plus particulièrement adaptées pour les procédés de biotransformation.

Pour augmenter davantage la quantité de NADPH disponible dans les microorganismes optimisés selon l'invention, il peut être également avantageux de
10 surexprimer au moins un gène choisi parmi *zwf*, *gnd*, *pntA*, *pntB*, *icd* et/ou de déléter au moins un gène choisi parmi *edd*, *aceA*, *aceB*, *aceK*.

Les gènes ci-dessus sont bien connus de l'homme du métier et décrits dans la littérature scientifique, notamment pour *E. coli* et *S. cerevisiae* :

Gènes et références dans *E. coli* :

- 15 *udhA* : X66026 soluble pyridine transhydrogenase;
- gor* : L02312 quinone oxidoreductase;
- pgi* : X15196 phosphoglucose isomerase (EC 5.3.1.9);
- pfkA* : X02519 phosphofructokinase-1;
- pfkB* : K02500 phosphofructokinase-2 ;
- 20 *edd* : X63694 6-phosphogluconate hydratase ;
- aceA* : X12431 isocitrate lyase (EC 4.1.3.1);
- aceB* : X12431 malate synthase (EC 4.1.3.2);
- aceK* : M18874 isocitrate dehydrogenase kinase/phosphatase ;
- zwf* : M55005 glucose 6-phosphate dehydrogenase;
- 25 *gnd* : K02072 6-phosphogluconate dehydrogenase;
- pntAB* : X04195 pyridine nucleotide transhydrogenase subunits alpha and beta (EC 1.6.1.1.);
- icd* : J02779 isocitrate dehydrogenase.
- lpd* : V01498 lipoamide dehydrogenase (= EC 1.8.1.4) impliquée dans le complexe
30 Pyruvate dehydrogenase;

gapA : AE000273 (201...1196) glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A (EC 1.2.1.12).

Gènes et références dans *S. cerevisiae* :

zta1 : NC_001134 NADPH:quinone reductase ;

pgi1 : NC_001134 Phosphoglucoisomerase;

5 *pfk1* : M26943 phosphofructokinase, alpha subunit ;

pfk2 : M26944 phosphofructokinase, beta subunit;

tdh1 : NC_001142 glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase;

tdh2 : NC_001142 glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase;

tdh3 : NC_001139 glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase.

10 Les gènes susceptibles d'être délétés ou surexprimés pour les souches optimisées selon l'invention sont définis principalement par l'emploi de la dénomination du gène de *E. coli*. Cependant, cet emploi a une signification plus générale selon l'invention et englobe les gènes correspondants d'autres microorganismes. En effet en utilisant les références GenBank des gènes d'*E. coli*, l'homme du métier est capable de déterminer

15 les gènes équivalents dans d'autres souches bactériennes qu'*E. coli*. Les moyens d'identification des séquences homologues et de leurs pourcentages d'homologie sont bien connus de l'homme du métier, comprenant notamment le programme BLAST qui peut être utilisé à partir du site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> avec les paramètres indiqués par défaut sur ce site. Les séquences obtenues peuvent alors être

20 exploitées (e.g. alignées) en utilisant par exemple les programmes CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) ou MULTALIN ((<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/cgi-bin/multalin.pl>), avec les paramètres indiqués par défaut sur ces sites.

Alternativement il est possible d'utiliser les PFAM ou les COG.

25 Les PFAM (Protein families database of alignments and Hidden Markov Models ; <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>) représentent une large collection d'alignements de séquences protéiques. Chaque PFAM permet de visualiser des alignements multiples, de voir des domaines protéiques, d'évaluer la répartition entre les organismes, d'avoir accès à d'autres bases de données, de visualiser des structures

30 connues de protéines.

Les COGs (Clusters of Orthologous Groups of proteins ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>) sont obtenus en comparant les séquences protéiques issus de 43 génomes complètement séquencés représentant 30 lignées phylogénétiques majeurs. Chaque COG est défini à partir d'au moins trois lignées ce qui permet ainsi
5 d'identifier des domaines conservés anciens.

Il est alors possible d'identifier des séquences consensus, et de dessiner des sondes dégénérées permettant de cloner le gène correspondant dans un autre organisme. Ces techniques de routine de biologie moléculaire sont bien connues dans l'art et sont décrites par exemple dans Sambrook *et al.* (1989 Molecular cloning : a laboratory
10 manual, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.).

Protéines analogues à la pyridine transhydrogenase soluble codée par *udhA* de *E. coli* (P27306)

NP_709766 : soluble pyridine transhydrogenase [*Shigella flexneri* 2a str. 301]

E65203 : probable dehydrogenase (EC 1.8.1.-) *udhA* - *Escherichia coli* (strain K-12)

15 NP_463005 : soluble pyridine nucleotide transhydrogenase [*Salmonella typhimurium* LT2]

Q8ZA97: soluble pyridine nucleotide transhydrogenase (STH) *Yersinia pestis*

P57112: soluble pyridine nucleotide transhydrogenase (STH) *Pseudomonas aeruginosa* PA01]

20 AF159108: soluble pyridine nucleotide transhydrogenase (sth) gene, *Azotobacter vinelandii*

AAN67764: soluble pyridine nucleotide transhydrogenase [*Pseudomonas putida* KT2440]

AAB50562: soluble pyridine nucleotide transhydrogenase [*Pseudomonas fluorescens*]

25 U91523: soluble pyridine nucleotide, *Pseudomonas fluorescens*

NC_003143: probable *sthA*, *Yersinia pestis* strain CO92,

P50529 : soluble pyridine nucleotide transhydrogenase *Vibrio cholera*

Proteines analogue à la quinone oxidoreductase codée par *gor* de *S. cerevisiae* (P38230, Zta1)

30 E87715 : quinone oxidoreductase CC3759 [imported] - *Caulobacter crescentus*

T40981: probable quinone oxidoreductase - fission yeast (*Schizosaccharomyces pombe*)

BAB48079: quinone oxidoreductase [*Mesorhizobium loti*]

A70871 : quinone oxidoreductase - *Mycobacterium tuberculosis* (strain H37RV)

NP_699755: quinone oxidoreductase [*Brucella suis* 1330]

5 BAC49848 : quinone oxidoreductase [*Bradyrhizobium japonicum* USDA 110]

S52923: NADPH2: quinone reductase (EC 1.6.5.5) - *Pseudomonas aeruginosa*

AI0039: NADPH2: quinone reductase (EC 1.6.5.5) - *Yersinia pestis* (strain CO92)

S45529: NADPH2: quinone reductase (EC 1.6.5.5) - *Escherichia coli* (strain K-12)

La présente invention a également pour objet un microorganisme optimisé pour
10 la production de NADPH telle que définie ci-dessus et ci-après, lequel comprend également, un ou plusieurs gènes codant des enzymes impliqués dans la biotransformation d'une molécule d'intérêt, ainsi qu'un ou plusieurs gènes marqueurs de sélection.

Ces gènes peuvent être natifs de la souche optimisée selon l'invention ou encore
15 introduits dans la souche optimisée selon l'invention par transformation avec un vecteur approprié, soit par intégration dans le génome du microorganisme ou encore par un vecteur réplcatif, ledit vecteur approprié portant un ou plusieurs gènes codant pour lesdites enzymes impliqués dans la biotransformation de ladite molécule d'intérêt et/ou lesdits marqueurs de sélection.

20 Ces gènes comprennent une séquence d'acide nucléique codant pour une enzyme impliquée dans la biotransformation de la molécule d'intérêt et/ou pour un marqueur de sélection, la séquence codante étant fusionnée à des séquences promotrices efficaces dans la cellule procaryote et/ou eucaryote choisie pour la biotransformation. Le vecteur (ou plasmide) peut-être un vecteur navette entre *E. coli* et un autre microorganisme.

25 La présente invention concerne également un procédé de préparation des souches optimisées selon l'invention telle que définie ci-dessus et ci-après, dans lequel on délète les gènes *udhA* et/ou *gor*, et le cas échéant on délète un gène pris parmi *pgi* ou *pfkA* et/ou *pfkB* et/ou on modifie au moins un gène codant des enzymes à NAD, en particulier *lpd* et/ou *gapA*, afin qu'elles utilisent préférentiellement le NADP (Bocanegra, J.A.
30 Scrutton, N.S. ; Perham, R.N. (1993) Creation of an NADP-dependent pyruvate

dehydrogenase multienzyme complex by protein engineering. *Biochemistry* **32** : 2737-2740), et le cas échéant on délète au moins un gène choisi parmi *edd*, *aceA*, *aceB*, *aceK* ; ces délétions et modifications étant réalisées par un moyen approprié, et/ou on surexprime au moins un gène choisi parmi *zwf*, *gnd*, *pntA*, *pntB*, *icd* soit en transformant la souche avec un vecteur approprié permettant la surexpression, soit en modifiant la force du promoteur endogène contrôlant le gène à surexprimer.

Le choix de la souche optimisée pour le ratio NADPH/NADP sera déterminé en fonction du type de biotransformation (fermentation ou bioconversion), de la demande totale en NADPH de la voie de bioconversion considérée, de la nature de(s) source(s) carbonée(s), de la demande en flux de biomasse, ...

La délétion du gène *pgi* ou *pfkA* et/ou *pfkB* devrait s'imposer lorsque l'on n'est pas capable de maîtriser la répartition du flux de carbone entre la glycolyse et la voie des pentoses phosphate. La délétion du gène *pgi* sera préférentiellement retenue pour les fermentations ou lorsque la demande en NADPH nécessite, au minimum, un flux de réduction de 2 moles de NADP par mole de glucose importée. La délétion du gène *pfkA* sera préférentiellement choisie pour les bioconversions ou lorsque la demande en NADPH nécessite, au minimum, un flux de réduction de 3-4 moles de NADP par mole de glucose importée. La modification, telle que décrite ci-dessus et ci-après, des gènes *lpd* et/ou *gapA* sera réalisée pour optimiser les souches *E. coli* $\Delta(\textit{udhA}, \textit{qor})$ ou *E. coli* $\Delta(\textit{udhA}, \textit{qor}, \textit{pgi})$ ou *E. coli* $\Delta(\textit{udhA}, \textit{qor}, \textit{pfkA})$ et notamment lorsque les biotransformations nécessiteront un flux de réduction, au minimum, supérieur à 3 moles de NADP par mole de glucose importé. Les autres modifications citées, à savoir délétion d'au moins un gène pris parmi *edd*, *aceA*, *aceB*, *aceK* ou surexpression d'au moins un gène pris parmi *zwf*, *gnd*, *pntA*, *pntB*, *icd*, pourront être réalisées afin d'affiner l'optimisation du ratio NADPH/NADP aux besoins de la cellule et du procédé de biotransformation considéré.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, le procédé de préparation des souches selon l'invention comprend également la transformation des souches optimisées avec au moins un vecteur approprié comprenant un ou plusieurs gènes codant

une ou des enzymes impliqués dans la biotransformation d'une molécule d'intérêt, ainsi qu'un ou plusieurs gènes marqueurs de sélection.

La souche optimisée pour la production de NADPH est obtenue par biologie moléculaire. L'homme du métier connaît les protocoles permettant de modifier le caractère génétique des microorganismes. Les techniques de transformation sont documentées et sont à la portée de l'homme du métier (Sambrook *et al.*, 1989 Molecular cloning : a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.).

L'inactivation d'un gène chez *E. coli* se fait préférentiellement par recombinaison homologue (Datsenko, K.A. ; Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97** : 6640-6645). Le principe d'un protocole en est rappelé brièvement : on introduit dans la cellule un fragment linéaire, obtenu *in vitro*, comprenant les deux régions flanquant le gène, et au moins un gène de sélection entre ces deux régions (généralement un gène de résistance à un antibiotique), ledit fragment linéaire présentant donc un gène inactivé. On sélectionne les cellules ayant subies un événement de recombinaison et ayant intégré le fragment introduit par étalement sur milieu sélectif. On sélectionne ensuite les cellules ayant subi un événement de double recombinaison, dans lesquelles le gène natif a été remplacé par le gène inactivé. Ce protocole peut être amélioré en utilisant des systèmes de sélections positive et négative, afin d'accélérer la détection des événements de double recombinaisons.

L'inactivation d'un gène chez *S.cerevisiae* se fait préférentiellement par recombinaison homologue (Baudin *et al.*, *Nucl. Acids Res.* **21**, 3329-3330, 1993; Wach *et al.*, *Yeast* **10**, 1793-1808, 1994; Brachmann *et al.*, *Yeast*. **14** :115-32, 1998).

La surexpression d'un gène peut être effectuée par changement du promoteur de ce gène *in situ*, par un promoteur fort ou inductible. De façon alternative, on introduit, dans la cellule, un plasmide réplcatif (simple ou multicopies) dans lequel le gène que l'on désire surexprimer est sous le contrôle du promoteur adéquat. Dans le cas de modification d'*Escherichia coli*, on pourra par exemple utiliser les promoteurs *Plac-o*, *P_{trc}-o*, *ptac-o*, trois promoteurs forts bactériens pour lesquels l'opérateur lac (*lacO*) a été

déléte pour les rendre constitutifs. Dans le cas de modifications de *Saccharomyces cerevisiae*, on pourra par exemple utiliser les promoteurs *Ppgk*, *Padh1*, *Pgal1*, *Pgal10*.

Un autre aspect de l'invention concerne l'utilisation de ces souches optimisées selon l'invention pour les biotransformations NADPH-dépendantes permettant ainsi une
5 amélioration du rendement de biotransformation par rapport à une souche non optimisée pour le NADPH.

Les biotransformations seront réalisées en utilisant des souches définies selon l'invention dans lesquelles seront exprimés des gènes codants des enzymes catalysant des réactions NADPH-dépendantes. L'homme du métier saura aisément identifier de
10 telles enzymes, on citera pour exemples et sans que cette liste soit limitative les enzymes suivantes : EC 1.1.1.10 L-xylulose reductase, EC 1.1.1.51 3(or 17) β -hydroxysteroid dehydrogenase, EC 1.1.1.54 allyl-alcohol dehydrogenase, EC 1.1.1.80 isopropanol dehydrogenase, EC 1.1.1.134 dTDP-6-deoxy-L-talose 4-dehydrogenase, EC 1.1.1.149 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase, EC 1.1.1.151 21-hydroxysteroid dehydrogenase,
15 EC 1.1.1.189 prostaglandin-E₂ 9-reductase, EC 1.1.1.191 indole-3-acetaldehyde reductase EC 1.1.1.207 (-)-menthol dehydrogenase, EC 1.1.1.234 flavanone 4-reductase, EC 1.2.1.50 long-chain-fatty-acyl-CoA reductase, EC 1.3.1.4 cortisone α -reductase, EC 1.3.1.23 cholestenone 5 β -reductase, EC 1.3.1.70 Δ^{14} -sterol reductase, EC 1.4.1.12 2,4-diaminopentanoate dehydrogenase, EC 1.5.1.10 saccharopine dehydrogenase, L-glutamate-forming, EC 1.7.1.6 azobenzene reductase, EC 1.8.1.5 2-oxopropyl-CoM reductase (carboxylating), EC 1.10.1.1 *trans*-acenaphthene-1,2-diol dehydrogenase, EC 1.14.12.3 benzene 1,2-dioxygenase, EC 1.14.12.8 4-sulfobenzoate 3,4-dioxygenase, EC 1.14.12.15 terephthalate 1,2-dioxygenase, EC 1.14.12.18 biphenyl 2,3-dioxygenase, EC 1.14.13.7 phenol 2-monooxygenase, EC 1.14.13.12 benzoate 4-monooxygenase, EC 1.14.13.26 phosphatidylcholine 12-monooxygenase, EC 1.14.13.64 4-hydroxybenzoate 1-hydroxylase, EC 1.14.13.70 sterol 14-demethylase, EC 1.16.1.5 aquacobalamin reductase, EC 1.17.1.1 CDP-4-dehydro-6-deoxyglucose reductase, EC 1.18.1.2 ferredoxin—NADP reductase.

L'invention concerne aussi un procédé de production d'une molécule d'intérêt dont au moins une des réactions de la voie de biosynthèse est NADPH dépendante caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) mise en culture des microorganismes optimisés selon l'invention dans un milieu
5 de culture approprié favorisant leur croissance et comprenant les substances nécessaires pour la réalisation de la biotransformation par fermentation ou biotransformation, à l'exception du NADPH, et
- b) extraction de la molécule d'intérêt du milieu et le cas échéant purification.

De manière préférentielle, la molécule d'intérêt est choisie parmi des acides aminés, des
10 vitamines, des stérols, des flavonoides, des acides gras, les polyols, les acides organiques. Pour les acides aminés ou leurs précurseurs on citera en particulier lysine, méthionine, thréonine, proline, acide glutamique, homoserine, isoleucine, valine. Pour les vitamines ou leurs précurseurs on citera notamment le pantoate, le *trans*-neurosporène, la phylloquinone, les tocopherols. Pour les stérols on citera notamment le
15 squalène, le cholestérol, la testostérone, la progesterone, la cortisone. Pour les flavonoides on citera notamment la frambinone et la vestitone. Pour les acides organiques on citera l'acide coumarique, l'acide 3-hydroxypropionique. Pour les polyols on citera le sorbitol, le xylitol, le glycérol.

Dans le cas d'une bioconversion, le procédé comprend aussi l'ajout du substrat à
20 « convertir » dans le milieu de culture approprié.

Le milieu de culture cité à l'étape b) du procédé selon l'invention défini ci-dessus comprend au moins un carbohydrate assimilable choisi parmi différents sucres assimilables, tels le glucose, le galactose, le saccharose, le lactose, ou les mélasses, ou les sous-produits de ces sucres. Une source de carbone simple tout particulièrement
25 préférée est le glucose. Une autre source de carbone simple préférée est le saccharose. Le milieu de culture peut en outre contenir une ou plusieurs substances (e.g. acides aminés, vitamines, sels minéraux, ...) favorisant la croissance du microorganisme et/ou la production de la molécule d'intérêt. En particulier, le milieu minéral de culture pour *E. coli* pourra ainsi être de composition identique ou similaire à un milieu M9
30 (Anderson, 1946, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 32:120-128), un milieu M63 (Miller,

1992 ; A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York) ou un milieu tel que défini par Schaefer *et al.* (1999, *Anal. Biochem.* 270 : 88-96).

5 La définition des conditions de biotransformation est du ressort de l'homme du métier. On fermente notamment les microorganismes à une température comprise entre 20°C et 55°C, de préférence entre 25°C et 40°C, plus particulièrement d'environ 30°C pour *S. cerevisiae* et d'environ 37°C pour *E. coli*.

10 Les exemples ne sont donnés qu'à titre d'illustration de l'invention et ne limitent en aucun le mode de réalisation ni la portée de l'invention.

EXEMPLES

Exemple 1 : Optimisations à réaliser afin d'améliorer le rendement de bioconversion du xylose en xylitol par *E. coli* ou par *S. cerevisiae*.

15 a) bioconversion avec *E. coli*.

Des modélisations prédictives sont réalisées en utilisant l'algorithme MetOpt®-Coli, un modèle stœchiométrique développé par la société Metabolic Explorer, qui permet de définir 1) le rendement maximal de production en xylitol à partir du xylose 2) la meilleure distribution de flux à partir du glucose pour assurer les besoins de
20 croissance et d'équilibres redox nécessaire pour le développement de la cellule et l'atteinte du rendement maximal de bioconversion.

Les paramètres imposés au modèle sont notamment 1) un flux d'import de glucose à 3 mmol.g⁻¹.h⁻¹, 2) un taux de croissance variable de 0, 0.15 et 0.25 h⁻¹, 3) un flux de la transhydrogénase membranaire (*pntAB*) variable et inférieur ou égal à 1
25 mmol.g⁻¹.h⁻¹. La valeur limite de flux de la transhydrogénase membranaire est déterminée à partir de la littérature (Hanson, 1979 ; Anderlund *et al.*, 1999 ; Emmerling *et al.*, 2002) ; 4) le flux de maintenance a été limité entre 5 et 22 mmol.g⁻¹.h⁻¹.

Les optimisations réalisées selon l'invention permettent d'améliorer la quantité de NADPH pouvant être produite (par réduction du NADP) et donc d'améliorer le flux
30 de bioconversion de xylitol (tableau 1). A titre d'information, les quantités maximales

théoriques de NADPH pouvant être produites (moles de NADPH produites pour 3 moles de glucose) à $\mu=0$ sont indiquées dans la dernière colonne du tableau 1. Les quantités maximales théoriques de NADPH pouvant être produites pour $\mu>0$ peuvent être déduite en tenant compte des besoins et productions liés à la synthèse de la biomasse. Lorsque le

5 flux de biotransformation du xylose en xylitol est inférieur à la quantité de NADPH produite, cela signifie que d'autres facteurs (e.g. maintenance) limitent la biotransformation.

Dans tous les cas le modèle suggère la délétion des gènes *udhA* et *qor*. On observe que la souche *E. coli* [$\Delta(\textit{udhA}, \textit{qor})$] permet une bioconversion optimale de

10 xylose en xylitol (donnée non montrée). Cependant, en pratique cette souche ne permettra pas d'obtenir le rendement optimum théorique car il sera difficile de maintenir la répartition adéquate de flux de carbone entre la voie des pentoses phosphate et celle de la glycolyse, cette répartition étant variable avec le taux de croissance. En pratique, on préférera donc utiliser les souches *E. coli* N°8 [*gapA*-NADP dépendent, *lpd*-NADP

15 dépendent, $\Delta(\textit{udhA}, \textit{qor}, \textit{pfkA})$] ou N°4 [*gapA*-NADP dépendent, *lpd*-NADP dépendent, $\Delta(\textit{udhA}, \textit{qor}, \textit{pgi})$], le choix entre ces deux souches étant fonction du taux de croissance de la souche lors du procédé de bioconversion. Cependant en fonction des caractéristiques réelles du procédé de bioconversion, d'autres souches du tableau peuvent être considérées, en outre il est possible d'affiner les souches modélisées,

20 notamment en effectuant des modifications supplémentaires telles que la surexpression d'au moins un gène choisi parmi *zwf*, *gnd*, *pntA*, *pntB* et *icd* et/ou la délétion d'au moins un gène choisi parmi *edd*, *aceA*, *aceB*, *aceK*.

N°	μ (h ⁻¹)	0	0.15	0.25	Quantité NADPH
1	Δpgi	5,47	5,21	3,67	12,00
2	$\Delta pgi +$ <i>gapA</i> NADP dependant	12,87	10,91	7,28	17,00
3	$\Delta pgi +$ <i>lpd</i> NADP dependant	17,00	10,39	5,98	17,00
4	$\Delta pgi +$ <i>gapA</i> NADP dependant + <i>lpd</i> NADP dependant	20,58	14,88	9,99	22,00
5	$\Delta pfkA$	20,27	13,94	0,56	28,00
6	$\Delta pfkA +$ <i>gapA</i> NADP dependant	24,47	16,63	3,05	29,50
7	$\Delta pfkA +$ <i>lpd</i> NADP dependant	25,00	16,79	5,32	31,00
8	$\Delta pfkA +$ <i>gapA</i> NADP dependant + <i>lpd</i> NADP dependant	28,00	19,13	7,80	32,50

Tableau 1: Flux optimal théorique de conversion du xylose en xylitol (mmol.g⁻¹.h⁻¹) par des souches d'*E. coli* optimisées dans leur capacité de réduction du NADPH.

b) bioconversion avec *S. cerevisiae*

Les modélisations prédictives sont réalisées en utilisant l'algorithme MetOpt®-Scere, un modèle stœchiométrique développé par la société, qui permet de définir 1) le rendement maximal de production en xylitol à partir du xylose 2) la meilleure distribution de flux à partir du glucose pour assurer les besoins de croissance et d'équilibres redox nécessaire pour le développement de la cellule et l'atteinte du rendement maximal de bioconversion.

Les paramètres imposés au modèle sont notamment 1) un flux d'import de glucose à 3 mmol.g⁻¹.h⁻¹, 2) un taux de croissance variable de 0, 0.15 et 0.25 h⁻¹, 3) un flux de maintenance inférieur ou égal à 22 mmol.g⁻¹.h⁻¹; 4) les réactions des aldéhydes déshydrogénases (ALD2, ALD3, ALD6) sont irréversibles et imposées dans le sens acétate + NAD(P)H → acétaldehyde + NAD(P); 5) la levure ne possède pas d'activités équivalentes à *udhA* ou *pntA,B*.

Le modèle permet de prendre en compte la compartimentation mitochondriale et peroxisomale.

Les optimisations réalisées selon l'invention permettent d'améliorer la quantité de NADPH pouvant être produite (par réduction du NADP) et donc d'améliorer le flux de bioconversion de xylitol (tableau 2). A titre d'information, les quantités maximales théoriques de NADPH pouvant être produites (moles de NADPH produites pour 3 moles de glucose) à $\mu=0$ sont indiquées dans la dernière colonne du tableau 2. Les quantités maximales théoriques de NADPH pouvant être produites pour $\mu>0$ peuvent être déduites en tenant compte des besoins et productions liés à la synthèse de la biomasse. Lorsque le flux de biotransformation du xylose en xylitol est inférieur à la quantité de NADPH produite, cela signifie que d'autres facteurs (e.g. maintenance) limitent la biotransformation.

Dans tous les cas, le modèle suggère la délétion du gène *zta1* (ubiquinone oxido-réductase, homologue de QOR). On observe que l'on pourrait utiliser la souche optimisée *S. cerevisiae* N°4 [*tdh1,2,3*-NADP dépendant, *lpd1*-NADP dépendant, $\Delta(zta1)$] où *tdh1,2,3* correspond respectivement aux gènes *tdh1*, *tdh2*, *tdh3* codant la glyceraldéhyde 3-P dehydrogenase NAD-dépendante dont la spécificité de co-substrat a été modifiée au profit du NADP. Cependant, en pratique il devrait être difficile d'obtenir le rendement optimum théorique avec cette souche car il sera difficile de maintenir la répartition adéquate de flux de carbone entre la voie des pentoses phosphate et celle de la glycolyse, cette répartition étant variable avec le taux de croissance. En pratique, on préférera donc utiliser la souche *E. coli* N°8 [*tdh1,2,3*-NADP dépendant, *lpd1*-NADP dépendant, $\Delta(zta1, pfkA)$]. Enfin, il sera possible d'affiner les souches en réalisant des modifications supplémentaires, notamment en effectuant des modifications supplémentaires telles que la surexpression d'au moins un gène choisi parmi *zwf*, *gnd*, *pntA*, *pntB* et *icd* et/ou la délétion d'au moins un gène choisi parmi *edd*, *aceA*, *aceB*, *aceK*..

N°	μ (h ⁻¹)	0	0.15	0.25	Quantité NADPH
1	Δpgi	7,25	6,01	5,19	7,25
2	$\Delta pgi +$ <i>tdh1,2,3</i> NADP dependant	12,67	10,51	9,08	12,67
3	$\Delta pgi +$ <i>lpd1</i> NADP dependant	12,25	9,88	8,31	12,25
4	$\Delta pgi +$ <i>tdh1,2,3</i> NADP dependant + <i>lpd1</i> NADP dependant	18,50	15,02	12,70	18,50
5	$\Delta pfk1,2$	36,00	24,55	16,91	36,00
6	$\Delta pfk1,2 +$ <i>tdh1,2,3</i> NADP dependant	36,00	27,34	21,56	36,00
7	$\Delta pfk1,2 +$ <i>lpd1</i> NADP dependant	36,00	25,32	18,19	36,00
8	$\Delta pfk1,2 +$ <i>tdh1,2,3</i> NADP dependant + <i>lpd1</i> NADP dependant	36,00	27,84	22,39	36,00

Tableau 2 : Flux optimal théorique de conversion du xylose en xylitol (mmol.g⁻¹.h⁻¹) par des souches de *S. cerevisiae* optimisées dans leur capacité à réduire le NADPH.

Exemple 2 : Construction de la souche *E. coli* $\Delta(udhA, qor)$

L'inactivation des gènes *udhA* et *qor* est réalisée en insérant une cassette de résistance à un antibiotique (chloramphénicol et kanamycine) tout en délétant la majeure partie du gène concerné. La technique utilisée est décrite par Datsenko, K.A. ; Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97** : 6640-6645. Pour cela on synthétise une paire d'oligonucléotides, chacun étant constitués de 100 pb dont 80 pb sont homologues avec le gène à déleter (e.g. *udhA*) et 20 pb sont homologues avec la cassette antibiotique porté par les plasmides pKD3 et pKD4 et que l'on amplifie par PCR en utilisant ces oligonucléotides.

Le produit PCR obtenu est alors introduit par électroporation dans la souche *E. coli* répliquant le plasmide pKD46 qui porte le gène codant la Red recombinase qui catalyse la recombinaison homologue. Les transformants résistants à chacun des

antibiotiques sont alors sélectionnés et l'insertion de la cassette de résistance est vérifiée par une analyse PCR.

Les cassettes de résistance au chloramphénicol et à la kanamycine peuvent ensuite être éliminées. Pour cela, Le plasmide pCP20 porteur de la recombinaise FLP agissant au niveau des sites FRT de la cassette de résistance au chloramphénicol ou à la kanamycine, est introduit dans les souches recombinantes par électroporation. Puis, après une série de cultures à 42°C, la perte de la cassette de résistance à l'antibiotique est vérifiée par une analyse PCR avec les mêmes oligonucléotides que ceux utilisés précédemment.

Pour des raisons pratiques, il peut être intéressant de déléter d'abord un gène, de supprimer le gène de résistance à l'antibiotique et de déléter le deuxième gène ensuite.

La souche obtenue est donc *E. coli* $\Delta(udhA, qor)$

Exemple 3 : Introduction du plasmide pxyI1 codant la xylose réductase dans la souche obtenue et biotransformation de xylitol

Le plasmide pxyI1 a été construit par insertion du gène xyI1 dans le vecteur Zero Blunt TOPO PCR cloning kit for sequencing (PCR4 TOPO vector, Invitrogen). Pour cela, le gène xyI1 (X59465) de *Pichia stipitis* a été amplifié par PCR avec la polymérase *Pwo* à partir de l'ADN chromosomique

Le produit PCR obtenu est ensuite directement cloné dans le vecteur Topo pour donner le plasmide pxyI1. Le vecteur Topo porte une origine de répllication pour *E. coli*, un gène de résistance à l'ampicilline et un gène de résistance à la kanamycine.

Le plasmide pxyI1 est alors introduit dans la souche *E. coli* DH5 α pour vérification de la construction. Le séquençage du gène xyI1 du plasmide pxyI1 avec les oligonucléotides universels M13 reverse et M13 forward est ensuite réalisé pour confirmer la construction.

Le plasmide validé est alors introduit dans la souche *E. coli* $\Delta(udhA, qor)$ (exemple 2) par électroporation.

La souche obtenue *E. coli* [$\Delta(udhA, qor)$ pxyI1] est alors cultivée en fed-batch, le milieu initial (milieu minimum) et le fed contenant du glucose et du xylose. Une souche *E. coli* [pxyI1] est cultivée dans les mêmes conditions.

Lorsque les cultures sont achevées on compare :

- l'évolution de la biomasse de chaque souche pendant la phase de bioconversion
- la quantité de xylitol produit dans le milieu extracellulaire.
- 5 - La quantité de xylitol accumulé dans les cellules
- la productivité en xylitol,
- le rendement glucose/xylitol

On pourra observer que la souche *E. coli* [$\Delta(udhA, qor)$ *pxyl1*] présente un rendement de production de xylitol accru par rapport à la souche non optimisée.

10

Exemple 4 : Construction de la souche *E. coli* $\Delta(udhA, qor, pgi)$ et biotransformation

L'inactivation du gène *pgi* est conduite en utilisant la technique décrite dans l'exemple 2 sauf que la souche initiale est la souche de l'exemple 2 au lieu d'être une souche sauvage. La construction est réalisée en milieu riche (e.g. LB). On introduit alors dans la souche obtenue *E. coli* $\Delta(udhA, qor, pgi)$ le plasmide *pxyl1* (exemple 3) par électroporation, et la souche résultante *E. coli* [$\Delta(udhA, qor, pgi)$ *pxyl1*] est sélectionnée sur milieu riche.

La souche obtenue *E. coli* [$\Delta(udhA, qor, pgi)$ *pxyl1*] est alors cultivée en fed-batch, le milieu initial (milieu minimum) et le fed contenant du glucose et du xylose. La souche *E. coli* [*pxyl1*] est cultivée dans les mêmes conditions.

Lorsque les cultures sont achevées on compare :

- l'évolution de la biomasse de chaque souche pendant la phase de bioconversion
- 25 - la quantité de xylitol produit dans le milieu extracellulaire.
- La quantité de xylitol accumulé dans les cellules
- la productivité en xylitol,
- le rendement glucose/xylitol

On pourra observer que la souche *E. coli* [$\Delta(udhA, qor, pgi)$ *pxyl1*] présente un rendement de production de xylitol accru par rapport à la souche non optimisée.

Exemple 5 : Construction de la souche *E. coli* $\Delta(udhA, qor, pfkA)$ et

5 biotransformation

L'inactivation du gène *pfkA* est conduite en utilisant la technique décrite dans l'exemple 2 sauf que la souche initiale est la souche de l'exemple 2 au lieu d'être une souche sauvage. La construction est réalisée en milieu riche (e.g. LB). On introduit alors dans la souche obtenue *E. coli* $\Delta(udhA, qor, pfkA)$ le plasmide *pxyl1* (exemple 3) par
10 électroporation, et la souche résultante *E. coli* [$\Delta(udhA, qor, pfkA)$ *pxyl1*] est sélectionnée sur milieu riche.

La souche obtenue *E. coli* [$\Delta(udhA, qor, pfkA)$ *pxyl1*] est alors cultivée en fed-batch, le milieu initial (milieu minimum) et le fed contenant du glucose et du xylose. La souche *E. coli* [*pxyl1*] est cultivée dans les mêmes conditions.

15 Lorsque les cultures sont achevées on compare :

- l'évolution de la biomasse de chaque souche pendant la phase de bioconversion
- la quantité de xylitol produit dans le milieu extracellulaire.
- La quantité de xylitol accumulé dans les cellules
- 20 - la productivité en xylitol,
- le rendement glucose/xylitol

On pourra observer que la souche *E. coli* [$\Delta(udhA, qor, pfkA)$ *pxyl1*] présente un rendement de production de xylitol accru par rapport à la souche non optimisée.

25 Exemple 6 : Construction de la souche *E. coli* [$\Delta(udhA, qor, pfkA, lpd)$ *lpd**] et biotransformation

Le gène *lpd* codant la dihydrolipoamide dehydrogenase NADH dépendante, impliquée dans le complexe multienzymatique pyruvate dehydrogénase, est délété en utilisant la technique décrite dans l'exemple 2 sauf que la souche initiale est la souche

décrite dans l'exemple 4 *E. coli* $\Delta(udhA, qor, pgi)$ au lieu d'être une souche sauvage. La construction et la sélection de la souche modifiée est réalisée en milieu riche (e.g. LB). La souche obtenue est *E. coli* $\Delta(udhA, qor, pgi, lpd)$.

Par ailleurs on construit le plasmide *plpd** qui permet la surexpression d'une dihydrolipoamide dehydrogenase NADPH dépendente. Il existe différentes possibilités pour modifier la spécificité de cosubstrat d'une enzyme. Par exemple Bocanegra *et al.* (1993) divulguent une méthode pour créer une dihydrolipoamide dehydrogenase NADPH dépendente.

Les plasmides *plpd** et *pxyl1* sont alors introduit par électroporation dans la souche *E. coli* $\Delta(udhA, qor, pgi, lpd)$, alternativement, on peut choisir de cloner *lpd** sur *pxyl1*; on obtiendrait alors le plasmide *plpd*pxyl1* que l'on introduirait par électroporation dans la souche *E. coli* $\Delta(udhA, qor, lpd)$. La construction et la sélection de la souche modifiée est réalisée en milieu riche (e.g. LB).

La souche obtenue *E. coli* [$\Delta(udhA, qor, pgi, lpd)$ *pxyl1, plpd**] est alors cultivée en fed-batch, le milieu initial (milieu minimum) et le fed contenant du glucose et du xylose. La souche *E. coli* [*pxyl1*] est cultivée dans les mêmes conditions.

Lorsque les cultures sont achevées on compare :

- l'évolution de la biomasse de chaque souche pendant la phase de bioconversion.
- la quantité de xylitol produite.
- La quantité de xylitol accumulé dans les cellules
- la productivité en xylitol,
- le rendement glucose/xylitol

On pourra observer que la souche *E. coli* [$\Delta(udhA, qor, pgi, lpd)$ *pxyl1, plpd**] présente un rendement de production de xylitol accru par rapport à la souche non optimisée.

Exemple 7 : Construction de la souche *S. cerevisiae* [$\Delta(pgi1)$, pRSGK-*xyl1*] et biotransformation

Le plasmide pRSGK1-*xy11* résulte du clonage du gène *xy11* de *Pichia stipitis*, amplifié par PCR en utilisant une polymérase thermorésistante de *Pyrococcus woesei* (*Pwo*), dans le vecteur pRSGK, sous le contrôle du promoteur P_{GK}. Le plasmide est ensuite introduit dans *S. cerevisiae*. La souche *S. cerevisiae* [pRSGK-*xy11*] obtenue est
5 ensuite utilisée pour déléter le gène *pgi*. L'inactivation du gène *pgi* est réalisée en insérant un marqueur (résistance à un antibiotique, auxotrophie) tout en délétant la majeure partie du gène concerné. La technique utilisée est décrite par Brachmann, C.B. ; Davies, A. ; Cost, G.J. ; Caputo, E. ; Li, J. ; Hieter, P. ; Boeke, J.D. (1998) Designer
10 deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C : a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications, *Yeast*, **14**: 115-32; on peut aussi utiliser la technique décrite par Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R., and Philippsen, P. (1994), New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, **10** : 1793-1808. Dans tous les cas on obtient une souche finale *S. cerevisiae* [$\Delta(pgi)$ pRSGK-*xy11*].

15 Alternativement, on peut aussi choisir d'introduire le plasmide pRSGK-*xy11* dans une souche mutée disponible, par exemple la souche Y23336 (EUROSCARF ; <http://www.rz.uni-frankfurt.de/FB/fb16/mikro/euroscarf/>) hétérozygote pour le gène *pgi* (Mat α/a ; his3D1/his3D1 ; leu2D0/leu2D0 ; lys2D0/LYS2 ; MET15/met15D0 ; ura3D0/ura3D0 ; YBR196c::kanMX4/YBR196c). Il est alors possible après sporulation
20 de récupérer une souche homozygote *S. cerevisiae* [$\Delta(pgi)$ pRSGK-*xy11*].

La souche obtenue *S. cerevisiae* [$\Delta(pgi)$ pRSGK-*xy11*] est alors cultivée en fed-batch , le milieu initial (YNB supplémenté) et le fed contenant du glucose et du xylose. Alternativement, le milieu initial pourrait être un milieu riche.

La souche contrôle *S. cerevisiae* [pRSGK-*xy11*] est cultivée dans les mêmes
25 conditions.

Lorsque les cultures sont achevées on compare :

- l'évolution de la biomasse de chaque souche pendant la phase de bioconversion.
- la quantité de xylitol produite.
- 30 - la quantité de xylitol accumulé dans les cellules

- la productivité en xylitol,
- le rendement glucose/xylitol

On pourra observer que la souche *S. cerevisiae* [$\Delta(pgi)$ pRSGK-*xy11*] présente un rendement de production de xylitol accru par rapport à la souche non optimisée.

5

Exemple 8 : Construction de la souche *S. cerevisiae* $\Delta(zta1, pgi1)$ et biotransformation

On utilise la souche Y33183 (génotype : BY4743; Mat a/ α ; *his3D1/his3D1*; *leu2D0/leu2D0*; *lys2D0/LYS2*; *MET15/met15D0*; *ura3D0/ura3D0*;
 10 *YBR046c::kanMX4/YBR046c::kanMX4*) disponible auprès d'EUROSCARF et dont les deux gènes *zta1* (= YBR046c) sont délétés. La souche est alors transformée par le plasmide pRSGK-*xy11* (exemple 7) puis la délétion du gène *pgi* est réalisée selon l'approche employée dans l'exemple 7.

La souche obtenue *S. cerevisiae* [$\Delta(zta1, pgi1)$ pRSGK-*xy11*] est alors cultivée
 15 en fed-batch en milieu minimum (YNB) supplémenté avec un fed en glucose/xylose.

La souche contrôle *S. cerevisiae* [pRSGK-*xy11*] est cultivée dans les mêmes conditions.

Lorsque les cultures sont achevées on compare :

- l'évolution de la biomasse de chaque souche pendant la phase de
 20 bioconversion.
- la quantité de xylitol produite.
- la quantité de xylitol accumulé dans les cellules
- la productivité en xylitol,
- le rendement glucose/xylitol

25 On observe que la souche *S. cerevisiae* [$\Delta(zta1, pgi1)$ pRSGK-*xy11*] présente un rendement de production de xylitol accru par rapport à la souche non optimisée.

Exemple 9 : Construction de la souche *S. cerevisiae* $\Delta(zta1, pfk1, pfk2)$ et biotransformation

On utilise la souche Y33183 (génotype : BY4743; Mat a/α; his3D1/his3D1; leu2D0/leu2D0; lys2D0/LYS2; MET15/met15D0; ura3D0/ura3D0; YBR046c::kanMX4/YBR046c::kanMX4) disponible auprès d'EUROSCARF et dont les deux gènes *zta1* (= YBR046c) sont délétés. La souche est alors transformée par le

5 plasmide pRSGK-*xy11* (exemple 7) puis les délétions des gènes *pfk1* et *pfk2* sont réalisées selon l'approche employée dans l'exemple 7. On peut éventuellement avoir recourt aux souches Y35893 [BY4743 ; Mat a/α; his3D1/his3D1; leu2D0/leu2D0; lys2D0/LYS2; MET15/met15D0; ura3D0/ura3D0; YGR240c::kanMX4/YGR240c::kanMX4] dont les deux gènes *pfk1* sont délétés, et

10 Y30791 [BY4743 ; Mat a/α; his3D1/his3D1; leu2D0/leu2D0; lys2D0/LYS2; MET15/met15D0; ura3D0/ura3D0; YMR205c::kanMX4/YMR205c::kanMX4] dont les deux gènes *pfk2* sont délétés. Ces deux souches sont disponibles auprès d'EUROSCARF.

La souche obtenue *S. cerevisiae* [$\Delta(zta1, pfk1, pfk2)$ pRSGK-*xy11*] est alors

15 cultivée en fed-batch, le milieu initial (YNB supplémenté) et le fed contenant du glucose et du xylitol. Alternativement, le milieu initial pourrait être un milieu riche.

La souche contrôle *S. cerevisiae* [pRSGK-*xy11*] est cultivée dans les mêmes conditions.

Lorsque les cultures sont achevées on compare :

- 20
- l'évolution de la biomasse de chaque souche pendant la phase de bioconversion.
 - la quantité de xylitol produite.
 - la quantité de xylitol accumulé dans les cellules
 - la productivité en xylitol,
- 25
- le rendement glucose/xylitol

On pourra observer que la souche *S. cerevisiae* [$\Delta(zta1, pfk1, pfk2)$ pYES-*xy11*] présente un rendement de production de xylitol accru par rapport à la souche non optimisée.

Exemple 10 : Comparaison entre valeurs expérimentales et prédictions par le modèle métabolique pour l'optimisation de la production de xylitol par *Escherichia coli*

On pourra observer une bonne corrélation entre les modélisations prédictives (exemple 1) et les réalisations expérimentales décrites dans les exemples 3,4,5 et 6.

Les exemples 1 à 9 ci-dessus sont des applications particulières du brevet et n'en limitent pas l'utilisation. L'homme de l'art saura aisément adapter ces exemples pour la biotransformation de molécules ayant une synthèse NADPH-dépendente. L'algorithme MetOpt® et la stratégie d'optimisation d'un procédé de bioconversion NADPH-dépendent via l'optimisation du ratio NADPH/NADP est validé ; cela nous permet en outre de revendiquer une application élargie à toutes les biotransformations NADPH dépendentes, qui pourront être modélisée et prévues par MetOpt® ou l'un de ses dérivés, en utilisant pour *E. coli*, *S. cerevisiae* ou tout autre microorganisme.

Exemple 11 : Prédications des modifications permettant l'amélioration de procédés de fermentation chez *E. coli*.

L'exemple 10 montre que les modèles MetOpt® développés par la société sont applicables aux bioconversions et devraient plus généralement s'appliquer aux biotransformations telles que les fermentations.

A titre d'exemples, le modèle MetOpt®-Coli est appliqué à la production de cystéine (Tableau 3) ou de 3-hydroxypropionate (Tableau 4) par fermentation du glucose par *E. coli*. Nous appliquons les mêmes paramètres que ceux précédemment utilisés, notamment : 1) un flux d'import de glucose à $3 \text{ mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, 2) un taux de croissance variable de 0, 0.15 et 0.25 h^{-1} , 3) un flux de la transhydrogénase membranaire (*pntAB*) variable et inférieur ou égal $1 \text{ mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$. La valeur limite de flux de la transhydrogénase membranaire est déterminée à partir de la littérature (Hanson, 1979 ; Anderlund *et al.*, 1999 ; Emmerling *et al.*, 2002) ; 4) le flux de maintenance a été limité entre 5 et $22 \text{ mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

a) cas de la production de cystéine par fermentation du glucose

Dans tous les cas le modèle suggère la délétion des gènes *udhA* et *qor*. On observe que la souche *E. coli* N°8 [*gapA*-NADP dépendent, *lpd*-NADP dépendent, $\Delta(\textit{udhA}, \textit{qor}, \textit{pgi})$] permet une production de cystéine optimale. Par ailleurs d'autres souches pourraient être tout aussi intéressantes (e.g. souches N° 2, 3). Enfin il est possible d'affiner les souches modélisées, notamment en effectuant des modifications supplémentaires telles que la surexpression d'au moins un gène choisi parmi *zwf*, *gnd*, *pntA*, *pntB* et *icd* et/ou la délétion d'au moins un gène choisi parmi *edd*, *aceA*, *aceB*, *aceK*.

N°	$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0	0.15	0.25
1	$\Delta\textit{pgi}$	1,99	1,12	0,27
2	$\Delta\textit{pgi}$ + <i>gapA</i> NADP dépendant	2,33	1,12	0,27
3	$\Delta\textit{pgi}$ + <i>lpd</i> NADP dépendant	2,33	1,12	0,27
4	$\Delta\textit{pgi}$ + <i>gapA</i> NADP dépendant + <i>lpd</i> NADP dépendant	2,33	1,12	0,27
5	$\Delta\textit{pfkA}$	1,20	0,55	0,02
6	$\Delta\textit{pfkA}$ + <i>gapA</i> NADP dépendant	1,85	0,89	0,19
7	$\Delta\textit{pfkA}$ + <i>lpd</i> NADP dépendant	2,13	1,08	0,38
8	$\Delta\textit{pfkA}$ + <i>gapA</i> NADP dépendant + <i>lpd</i> NADP dépendant	2,31	1,25	0,52

Tableau 3: Flux optimal théorique de production de cystéine ($\text{mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) par fermentation du glucose par des souches d'*E. coli* optimisées dans leur capacité de réduction du NADPH.

b) cas de la production de 3-hydroxypropionate par fermentation du glucose

Dans tous les cas le modèle suggère la délétion des gènes *udhA* et *qor*. On observe que la souche N°4 [*gapA*-NADP dépendent, *lpd*-NADP dépendent, $\Delta(\textit{udhA},$

gor, *pgi*)], enfin d'autres souches restent intéressantes (e.g. souches N° 2, 3). Enfin il reste possible d'affiner les souches modélisées, notamment en effectuant des modifications supplémentaires telles que la surexpression d'au moins un gène choisi parmi *zwf*, *gnd*, *pntA*, *pntB* et *icd* et/ou la délétion d'au moins un gène choisi parmi *edd*,
 5 *aceA*, *aceB*, *aceK*.

10

15

20

N°	μ (h ⁻¹)	0	0.15	0.25
1	Δpgi	4,00	2,37	0,89
2	Δpgi + <i>gapA</i> NADP dependant	5,29	2,98	0,89
3	Δpgi + <i>lpd</i> NADP dependant	5,45	2,98	0,89
4	Δpgi + <i>gapA</i> NADP dependant + <i>lpd</i> NADP dependant	5,47	2,98	0,89
5	$\Delta pfkA$	4,86	1,99	0,08
6	$\Delta pfkA$ + <i>gapA</i> NADP dependant	5,29	2,37	0,20
7	$\Delta pfkA$ + <i>lpd</i> NADP dependant	5,38	2,52	0,20
8	$\Delta pfkA$ + <i>gapA</i> NADP dependant + <i>lpd</i> NADP dependant	5,38	2,52	0,20

25

Tableau 4: Flux optimal théorique de production de 3-hydroxypropionate (mmol.g⁻¹.h⁻¹) par fermentation du glucose par des souches d'*E. coli* optimisées dans leur capacité de réduction du NADPH.

30

Exemple 12 : Prédiction des modifications permettant l'amélioration de procédé de fermentation impliquant *S. cerevisiae* ; application à la production d'hydrocortisone.

L'exemple 10 montre que les modèles MetOpt® développés par la société sont applicables aux bioconversions et devraient plus généralement s'appliquer aux biotransformations telles que les fermentations.

A titre d'exemple, Le modèle MetOpt®-Scere est appliqué à la production d'hydrocortisone (Tableau 5) par fermentation du glucose par *S. cerevisiae*. Nous appliquons les même paramètres que ceux précédemment utilisés, notamment : 1) un flux d'import de glucose à $3 \text{ mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, 2) un taux de croissance variable de 0, 0.15 et 0.25 h^{-1} , 3) un flux de maintenance inférieur ou égal à $22 \text{ mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$; 4) les réactions des aldéhydes déhydrogénases (ALD2, ALD3, ALD6) sont irréversibles et imposées dans le sens acétate + NAD(P)H \rightarrow acétaldéhyde + NAD(P); 5) la levure ne possède pas d'activités équivalentes à *udhA* ou *pntA,B*.

Le modèle permet de prendre en compte la compartimentation mitochondriale et peroxisomale.

Cette représentation des résultats (Tableau 5) permet de mettre en évidence l'apport réel de chacune des mutations dans l'amélioration de la production de NADPH et donc dans l'amélioration du flux de production d'hydrocortisone.

N°	$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0	0.15	0.25
1	Δpgi	0,12	0,08	0,06
2	$\Delta pgi +$ <i>tdh1,2,3</i> NADP dependant	0,21	0,14	0,10
3	$\Delta pgi +$ <i>lpd1</i> NADP dependant	0,20	0,14	0,10
4	$\Delta pgi +$ <i>tdh1,2,3</i> NADP dependant + <i>lpd1</i> NADP dependant	0,21	0,14	0,10
5	$\Delta pfk1,2$	/	/	/
6	$\Delta pfk1,2 +$ <i>tdh1,2,3</i> NADP dependant	/	/	/
7	$\Delta pfk1,2 +$ <i>lpd1</i> NADP dependant	/	/	/
8	$\Delta pfk1,2 +$ <i>tdh1,2,3</i> NADP dependant + <i>lpd1</i> NADP dependant	/	/	/

5 **Tableau 5: Flux optimal théorique de production d'hydrocortisone ($\text{mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
par fermentation du glucose par des souches de *S. cerevisiae* optimisées dans leur
capacité de réduction du NADPH.**

Dans tous les cas le modèle suggère la délétion des gènes *udhA* et *qor*. On
10 observe que la souche *S. cerevisiae* N°2 [*gapA*-NADP dépendent, $\Delta(\textit{udhA}, \textit{qor}, \textit{pgi})$],
même si d'autres souches pourraient être tout aussi intéressantes (e.g. souches N° 3, 4).
Par ailleurs, il est toujours possible d'affiner les souches modélisées, notamment en
effectuant des modifications supplémentaires telles que la surexpression d'au moins un
gène choisi parmi *zwf*, *gnd*, *pntA*, *pntB* et *icd* et/ou la délétion d'au moins un gène
15 choisi parmi *edd*, *aceA*, *aceB*, *aceK*. Enfin, On remarque que les souches dont les gènes
pfk1 et *pfk2* sont délétés sont incapables de produire de l'hydrocortisone, voir ne sont
pas viables. Ceci est dû au fait que la production d'hydrocortisone est davantage limitée
par la demande en carbone que par le besoin en NADPH. Une solution consiste à
permettre une légère expression d'une activité de type transhydrogénase chez la levure.
20 Cependant, les modélisations montrent que le flux de production d'hydrocortisone ne
seront jamais aussi bon que dans le cas d'une délétion du gène *pgi1*.

REFERENCES

- Anderson, E.H. (1946) Growth requirements of virus-resistant mutants of *Escherichia coli* strain "B", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **32**:120-128
- Baudin, A.; Ozier-Kalogeropoulos, O.; Denouel, A.; Lacroute, F. and Cullin, C. (1993)
 5 A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*,
Nucl. Acids Res. **21**, 3329-3330
- Bocanegra, J.A. Scrutton, N.S. ; Perham, R.N. (1993) Creation of an NADP-dependent pyruvate dehydrogenase multienzyme complex by protein engineering. *Biochemistry* **32** : 2737-2740
- 10 Brachmann CB, Davies A, Cost GJ, Caputo E, Li J, Hieter P, Boeke JD. (1998) Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast.* **14** :115-32.
- Datsenko, K.A. ; Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in
 15 *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97** : 6640-6645
- Miller, 1992 ; A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Sambrook et al. (1989 Molecular cloning : a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring
 20 Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York
- Schaefer U.; Boos, W.; Takors, R.; Weuster-Botz, D. (1999) Automated sampling device for monitoring intracellular metabolite dynamics., *Anal. Biochem.* **270** : 88-96
- Wach, A.; Brachat, A.; Pohlmann, R.; and Philippsen, P. (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*,
 25 *Yeast* **10**, 1793-1808, 1994.

REVENDICATIONS

1. Souche de microorganismes caractérisée en ce quelle comprend une
délétion du gène *udhA* et/ou du gène *qor* et/ou du gène *pgi*, à la condition que lorsque
5 ledit microorganisme est une bactérie, elle comprend au moins une délétion choisie
parmi le gène *udhA* ou le gène *qor*.
2. Souche selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend
également une délétion d'au moins un gène pris parmi un gène pris parmi *pgi* ou *pfkA*
et/ou *pfkB* et/ou on modifie au moins un gène codant des enzymes à NAD, en particulier
10 *lpd* et/ou *gapA*, afin qu'elles utilisent préférentiellement le NADP.
3. Souche selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle
comprend une surexpression d'au moins un gène choisi parmi *zwf*, *gnd*, *pntA*, *pntB* et
icd.
4. Souche selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle
15 comprend la délétion d'au moins un gène choisi parmi *edd*, *aceA*, *aceB*, *aceK*.
5. Souche selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce qu'elle
comprend un ou plusieurs gènes, endogène ou exogène, codant des enzymes impliqués
dans la biotransformation d'une molécule d'intérêt.
6. Souche selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce qu'elle
20 comprend un ou plusieurs gènes marqueurs de sélection.
7. Souche selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce qu'elle est
choisie parmi les bactéries, les levures et les champignons filamenteux.
8. Souche selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisée en ce qu'elle est
choisie parmi les espèces suivantes : *Aspergillus sp.*, *Bacillus sp.*, *Brevibacterium sp.*,
25 *Clostridium sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Escherichia sp.*, *Gluconobacter sp.*,
Pseudomonas sp., *Rhodococcus sp.*, *Saccharomyces sp.*, *Streptomyces sp.*, *Xanthomonas*
sp. et *Candida sp.*
9. Procédé de préparation des souches optimisées selon l'une des
revendications 1 à 8, caractérisé en ce que l'on délète les gènes *udhA* et/ou *qor*, et le cas
30 échéant on délète un gène pris parmi *pgi* ou *pfkA* et/ou *pfkB* et/ou on modifie au moins

un gène codant des enzymes à NAD, en particulier *lpd* et/ou *gapA*, afin qu'elles utilisent préférentiellement le NADP, et le cas échéant on délète au moins un gène choisi parmi *edd*, *aceA*, *aceB*, *aceK* ; ces délétions et modifications étant réalisées par un moyen approprié, et/ou on surexprime au moins un gène choisi parmi *zwf*, *gnd*, *pntA*,
5 *pntB*, *icd* soit en transformant la souche avec un vecteur approprié comprenant un ou plusieurs gènes codant une ou des enzymes impliquées dans la biotransformation d'une molécule d'intérêt et/ou un ou plusieurs gènes marqueur de sélection, soit en modifiant la force du promoteur endogène contrôlant le gène à surexprimer.

10 10. Procédé de production d'une molécule d'intérêt dont au moins une des réactions de la voie de biosynthèse est NADPH dépendante caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

c) mise en culture des microorganismes optimisés selon l'une des revendications 5 à 8 dans un milieu de culture approprié favorisant leur croissance et comprenant les substances nécessaires pour la réalisation de la biotransformation par
15 fermentation ou biotransformation, à l'exception du NADPH, et

d) extraction de la molécule d'intérêt du milieu et le cas échéant purification.

11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que la molécule d'intérêt est choisie parmi les acides aminés, les vitamines, les stérols, les flavonoides, les acides gras, les polyols et les acides organiques.

reçue le 01/12/03



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

N° 11235*02

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° ... 1 . 2
(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)		240975 D21726 FT	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		03-13 056	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) Souches de microorganismes optimisées pour des voies de biosynthèses consommatrices de NADPH			
LE(S) DEMANDEUR(S) : METABOLIC EXPLORER : BIOPOLE CLERMONT-LIMAGNE 63360 SAINT BEAUZIRE FRANCE - FRANCE			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		BOISART Cédric	
Prénoms			
Adresse	Rue	119, rue Fontgivière	
	Code postal et ville	63000 CLERMONT-FERRAND	
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		CHATEAU Michel	
Prénoms			
Adresse	Rue	Les Baumettes, Appt 47 - Bat E1	
	Code postal et ville	63200 RIOM	
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		GONZALEZ Benjamin	
Prénoms			
Adresse	Rue	4, rue Sidoine Apollinaire	
	Code postal et ville	63000 CLERMONT-FERRAND	
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)			
F. de T. h. g. CPI-94 1103			

BREVET D'INVENTION**CERTIFICAT D'UTILITÉ**

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° ... 2 ... 2

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260999

Vos références pour ce dossier (facultatif)		240975 D21726 FT	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		03.13.056	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) Souches de microorganismes optimisées pour des voies de biosynthèses consommatrices de NADPH			
LE(S) DEMANDEUR(S) : METABOLIC EXPLORER BIPOLE CLERMONT-LIMAGNE 63360 SAINT BEAUZIRE FRANCE - FRANCE			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		SOUCAILLE Philippe, Noel, Paul	
Prénoms			
Adresse	Rue	Chant du Coucou	
	Code postal et ville	31450 DEYME	
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		ZINK Olivier	
Prénoms			
Adresse	Rue	1, Place du Sauvage	
	Code postal et ville	63000 CLERMONT FERRAND	
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Franck Tébey CFI 94-1103			

